

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI  
(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

009401947 \*\*Image available\*\*

WPI Acc No: 1993-095457/199312

XRAM Acc No: C93-042149

Copolymer e.g. polyester for wide variety of rigid to elastic plastic materials - contg. 3-hydroxy butyrate and 3-hydroxy hexanoate obtd. by culturing microorganism genus aeromonas, used for biodegradable plastic

Patent Assignee: KANEKA CORP (KANF ) ; KANEKA CORP (KANF )

Inventor: KOBAYASHI G; SHIOTANI T

Number of Countries: 004 Number of Patents: 007

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
EP 533144	A2	19930324	EP 92115858	A	19920916	199312 B
JP 5093049	A	19930416	JP 91267255	A	19910917	199319
US 5292860	A	19940308	US 92945505	A	19920916	199410
EP 533144	A3	19940622	EP 92115858	A	19920916	199527
JP 2777757	B2	19980723	JP 91267255	A	19910917	199834
EP 533144	B1	19981216	EP 92115858	A	19920916	199903
DE 69227878	E	19990128	DE 627878	A	19920916	199910
			EP 92115858	A	19920916	

Priority Applications (No Type Date): JP 91267255 A 19910917

Cited Patents: No-SR.Pub; 2.Jnl.Ref; EP 440165; EP 69497

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
EP 533144	A2	E	16 C12P-007/62	
	Designated States (Regional):		DE GB	
JP 5093049	A	12	C08G-063/06	
US 5292860	A	11	C08G-063/06	
JP 2777757	B2	13	C08G-063/06	Previous Publ. patent JP 5093049
EP 533144	B1	E	C12P-007/62	
	Designated States (Regional):		DE GB	
DE 69227878	E		C12P-007/62	Based on patent EP 533144
EP 533144	A3		C12P-007/62	

Abstract (Basic): EP 533144 A

The copolymer contains a 3-hydroxy butyrate (3HB) and a 3-hydroxy hexanoate (3HHx)-units.

The prepn. involves culturing Aeromonas caviae using a fatty acid as a carbon source.

Pref. the copolymer may contain as a third component: 4 hydroxybutyrate (4HB) -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(I)-, 3 hydroxyvalerate (3HV), and/or 3-hydroxypropionate (3HP) -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-.

The prepn. is by the microorganism Aeromonas caviae and pref. the Fa- 440 strain of Aeromonas caviae (FERM BP 3432).

The naturally occurring oil or fat is corn-, soybean, safflower-, sunflower-, olive-, coconut, palm-, rapeseed, fish- or whale-oil, lard and/or beef tallow.

USE/ADVANTAGE - Rigid elastic plastics are obtd. by selecting copolymer components and adjusting their compsn. A novel copolymer polyester is produced which undergoes microbial degradation in natural environments, e.g. soil, rivers, and seas. The microorganisms involved use inexpensive starting materials.

Dwg. 0/3

Abstract (Equivalent): US 5292860 A

A copolymer consists of (A) pref. 50-98 mol.%, recurring units of 3-OH-butyrate -O-CH(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-C(O)- and (B) pref. 50-2 mol.%, 3-OH-hexanoate units -O-CH(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-C(O)-.

The copolymer can contain as 3rd and opt. 4th constituent recurring units of a 4-OH-butyrate -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-, a 3-OH-valerate -O-CH-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-C(O)- or a 3-OH-propionate -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-. The copolymer is produced by culturing a microorganism of genus Aeromonas, esp. Aeromonas caviae, in a culture medium under limitation of nutrients other than C sources and using as C source a fatty acid contg. an even number of at least 6 C or its lower alcohol ester or a

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-93049

(43)公開日 平成5年(1993)4月16日

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>

C 08 G 63/06  
C 12 P 7/62  
# (C 12 P 7/62  
C 12 R 1:01)

識別記号

N L P

序内整理番号

7211-4J

8114-4B

F 1

技術表示箇所

(21)出願番号

特願平3-267255

(22)出願日

平成3年(1991)9月17日

(71)出願人 000000941

鐘淵化学工業株式会社

大阪府大阪市北区中之島3丁目2番1号

(72)発明者 塩谷 武修

兵庫県加古川市野口町野口286-1 A-  
906

(72)発明者 小林 元太

兵庫県高砂市高砂町沖浜町2-63

(74)代理人 弁理士 細田 芳徳

(54)【発明の名称】 共重合体およびその製造方法

(57)【要約】

【構成】 3-ヒドロキシブチレート(3HB)ユニットと3-ヒドロキシヘキサノエート(3HHx)ユニットを含む共重合体、少なくとも3HBユニットと3HHxユニットを含有する3成分系共重合体、少なくとも3HBユニットおよび3HHxユニットを含有する4成分系共重合体；これらの共重合体を合成するアエロモナス・キャビエ；アエロモナス属の微生物を用いた前記の共重合体の製造方法に関する。

【効果】 長鎖脂肪酸を資化してC<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>ユニットを合成することができ、3HHxは3HVよりもメチレン基が1個多いので可塑性が高く、柔軟性を付与する能力を有し、3HPも強度を保持しながらも彈性を与えることができる。

肪酸または③4-ヒドロキシ酪酸もしくはアーブチロラクトンのいずれか2種を用いて、炭素源以外の栄養源の制限下で培養することを特徴とする、3-ヒドロキシブチレート(3HB)ユニットおよび3-ヒドロキシヘキサノエート(3H11X)ユニットと、さらに前記それぞれの炭素源に対応する①3-ヒドロキシプロピオネート(3IP)ユニット、②3-ヒドロキシバリレート(3IV)ユニットまたは③4-ヒドロキシブチレート(4HB)ユニットのいずれか2つのユニットの4成分系のモノマーユニットからなる共重合体の製造方法。

【請求項1】 天然油脂としてコーン油、大豆油、サラワード油、サンフラワー油、オリーブ油、ヤシ油、バーム油、ナタネ油、魚油、鯨油、豚脂、牛脂の少なくとももいずれかを用いる請求項7、9または10記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は新規共重合体ポリエステルおよびこれを発酵合成する微生物およびその製造方法に関する。詳しくは自然環境(土中、河川、海中)の下で微生物の作用を受けて分解するプラスチック様高分子およびその製造方法に関するものである。

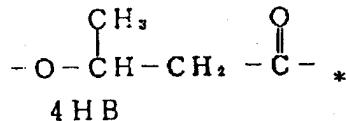
【0002】

【従来の技術・発明が解決しようとする課題】 現在まで数多くの微生物において、エネルギー貯蔵物質としてポリエステルを菌体内に蓄積することが知られている。その代表例がポリ- $\beta$ -ヒドロキシブチレート(以下、P(3HB)と略す)であり、下記の式で示されるモノマーユニット(3HB)からなるホモポリマーである。

【0003】

【化6】

3HB

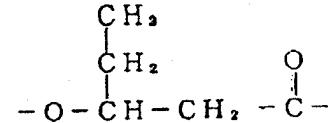


30

【0006】

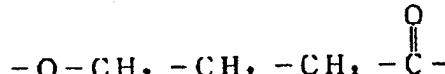
【化7】

3IV



【0007】

【化8】



【0008】 (2) 特開昭63-226291号公報によれば、炭化水素資化菌であるシードモナス・オレオボランスATCC29347に炭素源としてアルカンを与えることにより、炭素数が6~12までの3-ヒドロキシアルカノニート(3HAと略す)をモノマーユニットとする共重合体P(3HA)を発酵合成することが

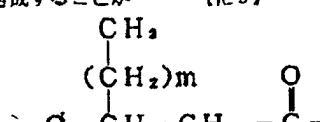
40

できることが報告されている。ここで、3HAの各モノマーユニット構造と炭素数との関係を明確に表現するために、このモノマーユニットをC<sub>x</sub>ユニットと呼ぶこととする。

【0009】

【化9】

3HA



(x=m+4)

ヒドロキシブチレート(4HB)ユニットのいずれか1つのユニットの3成分系のモノマーユニットからなる共重合体の製造方法。

(1) アエロモナス属の微生物を、炭素源として炭素数6以上の偶数個の脂肪酸もしくはその低級アルコールエステルまたは天然油脂と、①5-クロロ吉草酸もしくはブロビオン酸、②炭素数5以上の奇数個の脂肪酸または③4-ヒドロキシ酪酸もしくはアーブチロラクトンのいずれか2種を用いて、炭素源以外の栄養源の制限下で培養することを特徴とする、3-ヒドロキシブチレート(3HB)ユニットおよび3-ヒドロキシヘキサノエート(3HHx)ユニットと、さらに前記それぞれの炭素源に対応する①3-ヒドロキシブロビオネート(3HP)ユニット、②3-ヒドロキシバリレート(3HV)ユニットまたは③4-ヒドロキシブチレート(4HB)ユニットのいずれか2つのユニットの4成分系のモノマーユニットからなる共重合体の製造方法に関するものであ\*

3HP

\*る。

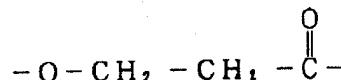
【0017】アエロモナス属の微生物を用いた本発明のポリエステルの製造方法は、従来より報告されておらず、生合成メカニズムは解明されていないが、実施例にも示されるように次のような特徴を有する。

【0018】(1) 炭素数6以上の偶数個の脂肪酸もしくはその低級アルコールエステル、または天然油脂の主な構成成分である炭素数12~22の長鎖脂肪酸のうち、炭素数が偶数のものを炭素源としてポリエステルを発酵合成すると、C<sub>4</sub>、C<sub>6</sub>の2つのユニットからなる共重合体P(3HB-CO-3HHx)が得られる。

(2) 5-クロロ吉草酸もしくはブロビオン酸を炭素源としてポリエステルを発酵合成すると、β-ヒドロキシブロビオネート(3HP)の組成が60~2モル%の共重合体P(3HB-CO-3HP)が得られる。

【0019】

【化11】



【0020】(3) 炭素数5の吉草酸など炭素数が5以上の奇数個の脂肪酸を炭素源としてポリエステルを発酵合成すると、90モル%以上の3HVユニットを有するP(3HB-CO-3HV)が得られる。

(4) 4-ヒドロキシ酪酸もしくはアーブチロラクトンを炭素源としてポリエステルを発酵合成すると、P(3HB-CO-4HB)が得られる。

(5) 炭素数5以上の奇数個の脂肪酸と炭素数6以上の偶数個の脂肪酸の混合物を炭素源としてポリエステルを発酵合成すると、3HB、3HV、3HHxの3成分系の共重合体が得られる。

(6) オリーブオイル、吉草酸、4-ヒドロキシ酪酸を炭素源としてポリエステルを発酵合成すると、3HB、4HB、3HV、3HHxの4成分系の共重合体が得られる。

(7) グルコース、フルクトース、酢酸、酪酸を炭素源としてポリエステルを発酵合成すると、P(3HB)のホモポリマーが得られる。ポリマー生成量は酪酸では大

量に得られるが、グルコース、フルクトース、酢酸では微量である。

(8) カプロン酸やβ-ヒドロキシカプロン酸を炭素源として使用すると、C<sub>6</sub>ユニットの含量を高めることができる。

【0021】本発明の微生物は、前記のようなポリエステル合成能を有するアエロモナス属の微生物であれば特に限定されるものではない。その一例として、アエロモナス・キャビエ、アエロモナス・ハイドロフィラが挙げられる。アエロモナス・キャビエの菌学的性質はFA-440株について示される表1のとおりである。このような本発明の微生物の具体例として見いだされたFA-440株およびOL-338株は、兵庫県高砂市高砂町宮前町の土壤から分離されたものであり、その内のFA-440株は微研条寄第3432号として寄託されている。

【表1】

W) :  $C_6(3HHx) = 7.0 \sim 9.0 : 3.0 \sim 1.0$  の共重合体 P (3HB-CO-3HHx) を得ることができる。C<sub>4</sub> ユニット組成を高めたい場合は、炭素源としてカプロン酸やβ-ヒドロキシカプロン酸を共存させればよく、またC<sub>4</sub> ユニット組成を高めたい場合は、酪酸、β-ヒドロキシ酪酸を共存させればよい。その結果、C<sub>4</sub> (3HB) : C<sub>6</sub> (3HHx) = 5.0 ~ 9.8 : 5.0 ~ 2まで組成をコントロールすることができる。FA-4 410 株、OL-338 株のポリメラーゼはβ-ヒドロキシブチリルC<sub>6</sub> の方がβ-ヒドロキシヘキシルC<sub>6</sub> Aよりも親和性が高いため、C<sub>6</sub> ユニットリッチの共重合体を作ることはできない。ここで、天然油脂としてはコーン油、大豆油、サフラワー油、サンフラワー油、オリーブ油、ヤシ油、バーム油、ナタネ油、魚油、鰤油、豚脂、牛脂の少なくともいずれかを用いることができる。

【0025】また、アエロモナス属の微生物を5-クロロ古草酸やプロピオン酸を炭素源として発酵合成することにより、C<sub>3</sub> (3HP) 含量が4.0 ~ 6.0モル%のP (3HB-CO-3HP) が得られるが、この場合も上記と同様に3HBの原料となる酪酸、β-ヒドロキシ酪酸を共存させることによってC<sub>4</sub> ユニット含量を高めることができる。この結果、C<sub>4</sub> : C<sub>3</sub> = 4.0 ~ 9.8 : 6.0 ~ 2まで組成をコントロールすることができる。また、炭素数5の古草酸など炭素数が5以上の奇数個の脂肪酸を炭素源としてポリエステルを発酵合成すると、9.0モル%以上の3HVユニットを有するP (3HB-CO-3HV) を得ることができる。

【0026】また、炭素源として4-ヒドロキシ酪酸や4-ヒドロキシブチリルC<sub>6</sub> Aユニットを用いると、P (3HB-CO-4HB) を合成することができる。この点はアルカリゲネス、ユートロファンと同様であるが、同一培養条件ではアエロモナス属の微生物はアルカリゲネス、ユートロファンに比べ、3HB組成が高い傾向にある。炭素源として長鎖脂肪酸と4-ヒドロキシ酪酸の混合物を用いるとP (3HB-CO-3HHx-CO-4HB) を合成することができる。

【0027】また、前記のように炭素数6以上の偶数の脂肪酸もしくはその低級アルコールエステルまたは天然油脂を炭素源とした場合、C<sub>4</sub> 、C<sub>6</sub> の2つのユニットからなる共重合体を作り、古草酸(C<sub>6</sub> の脂肪酸)からもC<sub>6</sub> のみのポリエステルを作る性質を利用して、炭素数6以上の偶数の脂肪酸と古草酸(ないし炭素数5個以上の奇数酸)の混合炭素源を与えることにより、(C<sub>4</sub> + C<sub>6</sub>) ユニットとC<sub>6</sub> ユニット比を自由に調整できる3成分系の共重合体P (3HB-CO-3HV-CO-3HHx) を合成することができるし、又、古草酸のかわりにプロピオノ酸(C<sub>6</sub> の脂肪酸)を与えると(C<sub>4</sub> + C<sub>6</sub>) ユニットとC<sub>6</sub> ユニット比を自由に調整できる3成分系の共重合体P (3HB-CO-3HP-CO-3HHx) を合成することができる。

【0028】前記の3成分系の共重合体の場合と同様に、アエロモナス属の微生物を炭素源として炭素数6以上の偶数個の脂肪酸もしくはその低級アルコールエステルまたは天然油脂に加えて、5-クロロ古草酸もしくはプロピオン酸、炭素数5以上の奇数個の脂肪酸、または4-ヒドロキシ酪酸もしくは4-ヒドロキシブチリルC<sub>6</sub> Aユニット組成を高めたい場合は、酪酸、β-ヒドロキシ酪酸を共存させればよい。その結果、C<sub>4</sub> (3HB) : C<sub>6</sub> (3HHx) = 5.0 ~ 9.8 : 5.0 ~ 2まで組成をコントロールすることができる。FA-4 410 株、OL-338 株のポリメラーゼはβ-ヒドロキシブチリルC<sub>6</sub> Aよりも親和性が高いため、C<sub>6</sub> ユニットリッチの共重合体を作ることはできない。ここで、天然油脂としてはコーン油、大豆油、サフラワー油、サンフラワー油、オリーブ油、ヤシ油、バーム油、ナタネ油、魚油、鰤油、豚脂、牛脂の少なくともいずれかを用いることができる。

【0029】このように本発明においては、アエロモナス属の微生物の特徴を利用してC<sub>4</sub> ~ C<sub>6</sub> ユニットからなる種々の共重合体を発酵合成することができる。現在のところ、C<sub>4</sub> ~ C<sub>6</sub> ユニットの共重合体を合成する

20 株として、ロドスピリウム・ルプラムが報告されている(Int. J. Biol. Macromol., 1989, 11, 49)。即ち、フェーラーらは炭素数2 ~ 10のカルボン酸を炭素源としてポリエステルを発酵合成した結果を報告しているが、これによればポリエステルはC<sub>4</sub> 、C<sub>5</sub> 、C<sub>6</sub> ユニットの共重合体であって、アエロモナス属の微生物のようないくつかの特徴を有していない。従ってロドスピリウム・ルプラムでは(C<sub>4</sub> + C<sub>6</sub>) 成分とC<sub>6</sub> 成分を自由に調整できる性質を有していない。

30 【0030】また、酢酸や酪酸からC<sub>6</sub> ユニットが作られたり、プロピオン酸から100%のC<sub>6</sub> ユニットが作られるなど、アエロモナス属とは全く異なる合成メカニズムを有しているようである。ロドスピリウム・ルプラムが光合成細菌であり、光照射、嫌気的培養でポリエステル合成すること、炭素数7以下のカルボン酸で主に生育し、かつポリエステル合成することから、この菌株はアエロモナス属の様なβ-酸化経路によらないようと思われる。即ち、アエロモナス属の微生物が長鎖脂肪酸のβ-酸化に従って、C<sub>4</sub> 、C<sub>6</sub> ユニットの2成分を合成するのに対し、ロドスピリウム・ルプラムが合成するポリエステルには規則性が認められない。また、ロドスピリウム・ルプラムを用いてポリエステルを合成する際の問題は、フェーラーらの論文に記述されているように、微生物の生育が光の照射の下、嫌気的条件で培養されるため、増殖速度が極端に低いことである。

40 従って、ポリエステルの合成速度が非常に小さく、約0.5g dry cell/リットルの菌体を得るのに10日間も要しているなど実用性に欠けることが指摘されている。これに対し、アエロモナス属の微生物は好気的な条件で生育しポリエステル合成するので、20g dry cell

50 を用いて生育する。

【0037】オレイン酸を唯一の炭素源とした場合、 $3HB(C_4) : 3HHx(C_6) = 8.5 : 1.5$ の2成分系の共重合体が得られた。

【0038】実施例2

オレイン酸濃度を1.5、2.8、8.5、17.2g／リットルとして実施例1と同じ実験を行なった。その結果を同じく表2に示した。オレイン酸の濃度を低くしても $C_4$ 、 $C_6$ ユニットの2成分系の共重合体が得られるが、組成が変化し、オレイン酸濃度が低いほど $C_6$ ユニット組成が高くなつた。

【0039】実施例3

アエロモナスハイドロフィラOL-338株を用い、炭素源としてオリーブオイルを2.8、8.5、17.2、25.4g／リットルとして実施例2と同じ実験を行なつた。その結果、 $C_4$ 、 $C_6$ ユニットの2成分系の共重合体が得られたが、実施例2と異なり、組成比はオリーブオイル濃度に影響されずほぼ一定値を示した。

$$3HB : 3HHx = 9.0 \sim 9.2 : 1.0 \sim 8$$

$$(C_4) (C_6)$$

【0040】実施例4

炭素源として $\beta$ -ヒドロキシカプロン酸を用いる以外は、実施例3と同様の実験を行なつた。その結果、 $3HB : 3HHx = 5.1 : 4.9$ の2成分系の共重合体が得られた。

【0041】実施例5

炭素源としてプロピオニン酸を用いる以外は、実施例3と同様の実験を行なつた。その結果、 $3HB : 3HP = 4.5 : 5.5$ の2成分系の共重合体が得られた。

【0042】実施例6

炭素源として吉草酸を用いる以外は、実施例3と同様の実験を行なつた。その結果、 $3HB : 3HV = 2 : 9.8$ というほとんどP(3HV)ホモポリマーに近いポリマーが得られた。

【0043】実施例7

炭素源として4-ヒドロキシ酪酸を用いる以外は、実施例3と同様の実験を行なつた。その結果、 $3HB : 4HP = 7.5 : 2.5$ の2成分系の共重合体が得られた。

【0044】実施例8

炭素源として天然油脂であるコーン油を用いる以外は、実施例3と同様の実験を行なつた。その結果、 $3HB : 3HHx = 8.5 : 1.5$ の2成分系の共重合体が得られた。

【0045】実施例9

炭素源としてオレイン酸8g、吉草酸2gを用いる以外は、実施例3と同様の実験を行なつた。その結果、 $3HB(C_4) : 3HV(C_6) : 3HHx(C_6) = 4.4 : 4.8 : 8$ からなる3成分系の共重合体が得られた。

【0046】実施例10

炭素源としてオリーブオイル4.1g、吉草酸1.7gを用いる以外は、実施例3と同様の実験を行なつた。その結果、 $3HB(C_4) : 3HV(C_6) : 3HHx(C_6) = 8.0 : 2 : 11.2 : 8.6$ からなる3成分系の共重合体が得られた。

【0047】実施例11

炭素源としてオリーブオイル3.1g、4-ヒドロキシ酪酸0.69gを用いる以外は、実施例3と同様の実験を行なつた。その結果、 $3HB : 4HB : 3HHx = 8.4 : 4.7 : 7.7 : 7.9$ からなる3成分系の共重合体が得られた。

【0048】実施例12

炭素源としてオリーブオイル0.31g、吉草酸0.17g、4-ヒドロキシ酪酸0.69gを用いる以外は、

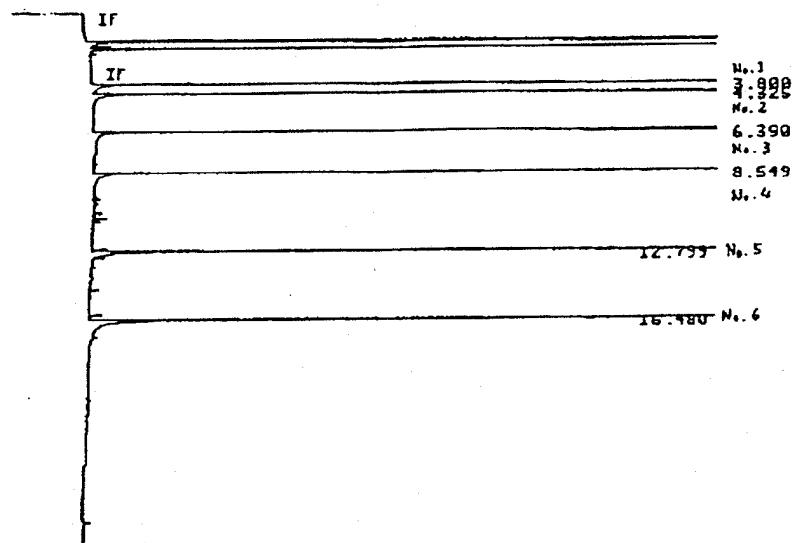
【0049】実施例3と同様の実験を行なつた。その結果、 $3HB : 4HB : 3HHx = 7.9 : 7.8 : 1.1 : 5.4 : 6.8$ からなる4成分系の共重合体が得られた。

【0049】

【発明の効果】微生物の発酵合成するポリエステルは、自然環境下で分解する生分解性プラスチックであるが、強い特異性を有する酵素の作用で合成されるため得られるポリエステルの構造は従来より限られたものであった。これは、微生物の遺伝的性質に基づいており、

(1) 資化しうる炭素源が微生物によって制限されていること、(2) 炭素源の代謝、ポリエステル合成経路も決定されていることに起因している。本発明においては、長鎖脂肪酸を資化して $C_4 \sim C_6$ ユニットを合成することができ、 $C_6$ ユニットである $3HHx$ は $3HV$ よりもメチレン基が1個多いので可塑性が高く、柔軟性を付与する能力を有する。また $C_6$ ユニットである $3HP$ も強度を保持しながらも弾性を与えることができる。このように、本発明によりアエロモナス属の微生物を用いると、剛性のプラスチックから彈性を帯びたプラスチックまで、共重合体の成分とその組成を調整することにより幅広くつくり出すことができる。特に、共重合体の成分として重要な $3HHx$ ( $C_6$ ユニット)は、安価な原料である天然油脂から合成することができるので、経済的にも非常に有利なものである。

[図1]



[図2]

